

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AN: PAT 2003-579326 .
TI: Preparation of biologically active microcapsules, useful e.
g. for implantation and production of active compounds,
comprises fusion of encapsulated cells
PN: DE10203628-A1
PD: 31.07.2003
AB: NOVELTY - Preparation of biologically active microcapsules
(MC) comprises encapsulating cells in a coating of
biocompatible polymer (I), where the new feature is that the
cells are subjected to a fusion treatment. DETAILED DESCRIPTION
- An INDEPENDENT CLAIM is also included for MC made of (I) and
containing fused cells. ACTIVITY - Cytostatic; Antiarthritic;
Hepatotropic; Antiinflammatory; Virucide; Neuroprotective;
Hemostatic; Antiparkinsonian. No supporting data provided.
MECHANISM OF ACTION - Gene Therapy.; USE - MC are useful in
transplantation surgery; for immuno-isolated transplantation
and/or for production of active agents, especially
pharmaceuticals, metabolites, nutrients or chemical precursors,
e.g. parathormone, insulin, erythropoietin, interferons,
endostatin, tumor necrosis factor alpha receptor or antibody,
coagulation factors or dopamine for treatment of e.g. hepatitis,
multiple sclerosis, tumors, Gaucher disease, rheumatoid
arthritis, hemophilia or Parkinson's disease (none claimed).
ADVANTAGE - Fusion of the cells results in microcapsules of
increased stability that remain intact and active for a long
time, during storage and/or after implantation. Fused cells do
not proliferate, so stresses on the inside wall of the capsule
(which can cause cracks or rupture) are avoided and
immunological isolation is maintained. Also in many cases
production of active compounds is improved (especially of high
molecular weight compounds), so release into the environment is
improved. Two or more types of cells, expressing different
compounds, can be encapsulated together.
PA: (ZIMM/) ZIMMERMANN U;
IN: ZIMMERMANN U;
FA: DE10203628-A1 31.07.2003;
CO: DE;
IC: B01J-013/02; C12N-005/00; C12N-005/12;
MC: A12-V01; B04-C02D; B04-C03; B04-F01; B11-B; B11-C04A;
B12-M11E; B14-A02; B14-C03; B14-C09B; B14-F08; B14-H01;
B14-J01A3; B14-N12; B14-S01; B14-S03; D05-H08; D05-H10;
DC: A96; B04; B07; D16;
PR: DE1003628 30.01.2002;
FP: 31.07.2003
UP: 27.08.2003

THIS PAGE BLANK (USPTO)

02P-18150



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 102 03 628 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 12 N 5/00
C 12 N 5/12
B 01 J 13/02

21 Aktenzeichen: 102 03 628.4
22 Anmeldetag: 30. 1. 2002
43 Offenlegungstag: 31. 7. 2003

DE 102 03 628 A 1

71 Anmelder:
Zimmermann, Ulrich, Prof. Dr., 97295 Waldbrunn,
DE
74 Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

72 Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Herstellung von stabilen, biologisch wirksamen Mikro kapseln
57 Es werden Verfahren zur Herstellung von biologisch wirksamen Mikro kapseln durch Einschließen von biologischen Zellen in einer Umhüllung aus einem biokompatiblen Polymermaterial beschrieben, bei denen die Zellen einer Fusionsbehandlung unterzogen werden. Es werden auch Mikro kapseln aus biokompatiblen Polymermaterial beschrieben, die fusionierte biologische Zellen enthalten.

DE 102 03 628 A 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Verkapselung von biologischen Zellen, insbesondere Verfahren zur Herstellung von biologisch wirksamen Mikrokapseln, die Zellen enthalten, durch Einschließen der Zellen in einem Polymermaterial. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Behandlung von Zellen, insbesondere Verfahren zur Fusion von Zellen, und Mikrokapseln, die biologische Zellen enthalten.

[0002] Es ist bekannt, bei allogenen oder xenogenen Transplantationen Immunreaktionen des Wirtsorganismus durch eine Mikroverkapselung des Transplantats zu dessen Immunisolierung zu begegnen (s. F. Lim et al. in "Science", Bd. 210, 1980, S. 908-910, H. A. Clayton et al. in "Acta Diabetol.", Bd. 30, 1993, S. 181-189). Für die Verkapselung von allogenen oder xenogenen, endokrinen Gewebes haben sich sphärische Alginatkapseln als vorteilhaft erwiesen (s. z. B. T. Zekorn et al. in "Acta Diabetol.", Bd. 29, 1992, S. 41-52, P. De Vos et al. in "Biomaterials", Bd. 18, 1997, S. 273-278, C. Hasse et al. in "Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes", Bd. 105, 1997, S. 53-56 und in "J. Microencapsulation", Bd. 14, 1997, S. 617-626).

[0003] Die Alginat sind Ca^{2+} - oder Ba^{2+} -vernetzt und für die Immunisolierung besonders wirksam, wenn sie gereinigt, d. h. möglichst frei von mitogenen Kontaminationen sind (s. U. Zimmermann et al. in "Electrophoresis", Bd. 13, 1992, S. 269-274, G. Klöck et al. in "Biomaterials", Bd. 18, 1997, S. 707-713, DE-OS 198 36 960). Aus DE-OS 199 04 785 ist bekannt, die Stabilität von Mikrokapseln durch Zusatz von Proteinen und/oder Perfluorkarbonen zum Polymermaterial und/oder eine Nachbehandlung mit Sulfat- oder anderen Anionen zu erhöhen.

[0004] Die Transplantation alginatumhüllten Gewebes wurde nicht nur in Tierversuchen, sondern auch in der Humanmedizin getestet. So wird beispielsweise von C. Hasse et al. in "The Lancet", Bd. 350, 1997, S. 1296, die Mikroverkapselungstechnik bei einer allogenen Nebenschilddrüsen-Transplantation im Muskelgewebe zweier Patienten mit permanenter symptomatischer Unterfunktion der Nebenschilddrüsen beschrieben. Nach der Behandlung mit Alginate-Immunisiertem Nebenschilddrüsen-Gewebe konnten die Patienten aus dem Krankenhaus entlassen werden, ohne hypokalzämische Symptome zu zeigen und ohne eine Therapie zur Unterdrückung von Immunreaktionen zu benötigen.

[0005] Obwohl mit der herkömmlichen Technik untoxische und für den Empfänger verträgliche Verkapselungsmaterialien zur Verfügung stehen, treten oftmals Probleme bei der Implantation verkapselter und gegebenenfalls gentechnologisch veränderter Zellen auf. So zeigte sich, wie schon bei Tierversuchen, dass die von C. Hasse et al. beschriebenen Transplantate nur für eine beschränkte Zeit wirksam waren, was auf das Verschwinden der Alginatumhüllungen zurückzuführen ist. Es ist ferner beobachtet worden, dass Kapseln bereits kurze Zeit nach der Transplantation Risse zeigen oder gesprengt werden, so dass die erwünschte Immunisolierung unwirksam wird. Es wurde auch festgestellt, dass Zellen aus den Kapseln herauswachsen und damit zu unerwünschten Immunabwehrreaktionen seitens des Immunsystems des Empfängers führen. Diese Erscheinungen sind darauf zurückzuführen, dass die in der Kapsel befindlichen Zellen proliferieren, d. h. die Zellen wachsen weiter unter ständiger Zellteilung. Ein weiterer Nachteil der Proliferation von Zellen in Mikrokapseln ergibt sich daraus, dass häufig die Proliferation und Produktion von therapeutisch wirksamen Substanzen umgekehrt korreliert sind. Damit sind die Produktion und Sezernierung von Faktoren, Hormonen und anderen Regulationsstoffen bei herkömmlichen

Kapseln in der Regel sehr gering.

[0006] Es ist allgemein bekannt, die Proliferation der Zellen chemisch durch die Zugabe von sogenannten Proliferationshemmern zu inhibieren. Dazu gehören beispielsweise Entkopplersubstanzen, die auf die Mitochondrien wirken, wie CCCP und FCCP. Diese Proliferationshemmer haben allerdings nachweislich den Nachteil, dass sie toxisch und daher medizinisch nicht zugelassen sind. Es ist ferner bekannt, die Teilungsfähigkeit von Zellen durch radioaktive Bestrahlung zu beeinträchtigen. Nachteilig ist jedoch, dass durch die Bestrahlung nicht alle Zellen ihre Proliferationsfähigkeit verlieren und damit nur eine zeitlich beschränkte Hemmung der Proliferation möglich ist.

[0007] Ein weiteres Problem bei herkömmlichen Transplantationen besteht darin, dass durch Scherkräfte oder andere physikalische und chemische Kräfte Haarrisse an der Kapsel auftreten können, so dass die eingeschlossenen Fremdzellen in Kontakt mit den Komponenten des Immunsystems kommen, was zu unerwünschten Immunabwehrreaktionen des Empfängers führt.

[0008] Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, verbesserte Verfahren zur Herstellung von biologisch wirksamen Mikrokapseln zur Verfügung zu stellen, die biologische Zellen enthalten und mit denen die Nachteile herkömmlicher Verkapselungstechniken überwunden werden. Es sollen insbesondere Mikrokapseln mit einer erhöhten Stabilität hergestellt werden können, die bei Lagerung und/oder nach Implantation in den Empfänger intakt und wirksam bleiben. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Mikrokapseln für Zelltransplantationen bereitzustellen, die sich durch eine erhöhte Langzeitstabilität auszeichnen.

[0009] Diese Aufgaben werden mit Verfahren und Mikrokapseln mit den Merkmalen gemäß Patentanspruch 1, 19 oder 20 gelöst. Die Unteransprüche definieren bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung.

[0010] Eine Grundidee der Erfindung ist es, biologisch wirksame Mikrokapseln mit biologischen Zellen bereitzustellen, die einer Fusionsbehandlung unterzogen worden sind. Durch diese Maßnahme wird vorteilhafterweise sichergestellt, dass die in den Mikrokapseln befindlichen Zellen nicht proliferieren. Nach Herstellung der Mikrokapseln wird eine Belastung der Kapseln von innen her vermieden. Eine Rissbildung oder gar Durchbrüche werden ausgeschlossen. Die in den Mikrokapseln befindlichen Zellen bleiben vom Kapselmaterial eingeschlossen. Die Kapseln bleiben für die Immunisierung der Zellen wirksam.

[0011] Die Erfinder haben festgestellt, dass die Proliferation der in der Kapsel eingeschlossenen fusionierten Zellen verhindert wird. Damit bleibt die Kapsel unbeschadet erhalten und kann über einen langen Zeitraum die immunisierende Wirkung ausüben. Da die Proliferation unterdrückt ist, kommt es in vielen Fällen in erfindungsgemäß hergestellten Mikrokapseln zu einer erhöhten Produktion der therapeutisch wirksamen Faktoren. Dies wirkt sich besonders vorteilhaft aus, wenn diese Faktoren ein hohes Molekulargewicht besitzen. Durch die hohe Substanzkonzentration in der Mikrokapsel wird die Abgabe an die Umgebung des Transplantationsortes gefördert.

[0012] Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn mindestens drei fusionierte Zellen verkapselt werden, weil dann eine Proliferation bereits weitgehend ausgeschlossen ist. Es ist allerdings auch möglich, die Zellen zu sogenannten "Riesenzellen" von mehr als drei Zellen (bis zu etwa 106 Zellen) zu fusionieren. In einer erfindungsgemäß hergestellten Mikrokapsel können ferner mehrere Zellen enthalten sein, die jeweils aus mehreren Zellen fusioniert sind.

[0013] Als biologische Zellen für die Fusion und Verkapselung

selung können erfindungsgemäß alle Zellen verwendet werden, allein oder kombiniert Wirkstoffe in ihre Umgebung sezernieren oder abgeben.

[0014] Zu den Wirkstoffen zählen im weitesten Sinne alle therapeutischen Faktoren für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen. Die biologischen Zellen können dabei aus Gewebe stammen oder in Form von Zelllinien verwendet werden.

[0015] Praktisch alle Zellen besitzen Oberflächenantigene. Diese Zelloberflächenproteine sind an der Regulation der Immunantwort sowie der Transplantatabstoßung beteiligt. Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden Zellen verwendet, die frei von Oberflächenantigenen sind, die MHC-Antigene der Klasse I umfassen. Da die MHC-Moleküle über Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen entdeckt wurden, erhielten sie die Bezeichnung "Transplantationsantigene" bzw. "Gewebsverträglichkeitskomplexe" (Major Histocompatibility Complex; MHC). Der Vorteil dieser Zellen besteht darin, dass auch im Fall einer Verletzung der Mikrokapsel (z. B. Bildung von Haarrissen durch äußere Einflüsse) keine Immunreaktion ausgelöst wird. Erfindungsgemäß können Zellen ohne MHC-Antigene, wobei diese Zellen gegebenenfalls zur Expression bestimmter merkmalspezifischer Gene genetisch transformiert sind, auch ohne die beschriebene Fusionsbehandlung verkapselt werden.

[0016] Die MHC-Antigene sind meist Glycoproteine, die in der Zelloberfläche verankert sind und aus zwei Polypeptidketten bestehen. Ihrer Funktion nach werden sie in verschiedene Klassen eingeordnet, d. h. in die Klassen I, II und III. Alle drei Klassen binden Peptidfragmente, die sie den Zellen des Immunsystems präsentieren. Die MHC-Antigene lassen sich auf allen kernhaltigen Zellen nachweisen. Sie präsentieren endogene Antigene und ermöglichen die Interaktion mit T_H-Zellen. Durch Stimulation zytotoxischer T-Zellen ist eine Transplantationsabstoßung auslösbar.

[0017] Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, dass, wenn die biologischen Zellen keine Oberflächenantigene insbesondere des Typs MHC aufweisen, vom Immunsystem ein Empfänger nicht als fremd erkannt werden, falls sie aus der schützenden Kapsel heraustreten.

[0018] Es werden als Oberflächenantigen-freie Zellen vorzugsweise Zellen verwendet, die zu einer Zelllinie von Burkitt-Zellen, insbesondere zur Burkitt-Zelllinie Ramos, gehören.

[0019] Falls die Oberflächenantigen-freien Zellen nicht die gewünschten Wirkstoffe produzieren, so werden sie gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung einer genetischen Transformation unterzogen, bei der den Zellen genetisches Material zugefügt wird, das die Produktion des mindestens einen Wirkstoffs kodiert.

[0020] Die genetische Transformation umfasst ein Einschleusen von Genen, die die gewünschten Wirkstoffe kodieren, bspw. in Burkitt-Zellen. Das Einschleusen erfolgt nach an sich bekannten Techniken, z. B. durch Elektroporation oder unter Verwendung von Kalziumphosphat.

[0021] Als Material für die Verkapselung können alle Polymere verwendet werden, die vom Empfänger ohne Weiteres akzeptiert werden. Dazu zählen natürliche oder synthetische Polymere. Welches Polymer verwendet wird, hängt von der Biokompatibilität und damit auch vom Transplantationsort ab. Fusionierte Zellen werden mit dem Polymermaterial in Kontakt gebracht und darin eingeschlossen, gefolgt von einer Vernetzung des Polymermaterials.

[0022] Es hat sich in der Praxis herausgestellt, dass als Material für die Verkapselung am günstigsten ein natürliches Polymer verwendet wird. Unter diesen natürlichen Polymeren werden bevorzugt Alginatpolymere verwendet. Die

Herstellung von Mikrokapseln mit Alginat als Kapselmateriale erfolgt vorzugsweise nach an sich bekannten Verfahren, wie sie beispielsweise in DE-OS 198 36 960, DE-OS 199 04 785 und DE-OS 42 04 012 beschrieben sind.

[0023] Erfindungsgemäße Mikrokapseln können die verschiedensten Formen besitzen, z. B. sphärische Formen oder insbesondere bei Verkapselung adhärenter Zellen je nach Gestalt der Festphase auch nicht-sphärische Formen.

[0024] Die Fusion der Zellen kann durch Behandlung im elektrischen Feld, mit chemischen Substanzen oder mit Viren erfolgen. Auf welche Weise die Fusion durchgeführt wird, hängt in der Regel von der späteren Verwendung der Zellen ab. Bei einer medizinischen Verwendung werden elektrische Verfahren bevorzugt, da die Behandlung mit Chemikalien oder inaktivierten Viren eine medizinische Zulassung erschwert.

[0025] Die Fusion im elektrischen Feld (Elektrofusion) ist mittlerweile eine an sich bekannte und entwickelte Methode (siehe U. Zimmermann et al. in "Electromanipulation of Cells" CRC Publisher, Boca Raton, USA, 1996 und U. Zimmermann in "Biochimica et Biophysica Acta", Bd. 694, 1982, Seite 227-277). Die Elektrofusion wurde beispielsweise erfolgreich zur Hybridisierung tierischer Zellen, wie Hybridomzellen, und Hefen angewendet. Die Elektrofusion hat gegenüber den anderen Fusionsverfahren den besonderen Vorteil, dass die Zahl der zu fusionierenden Zellen gezielt eingestellt werden kann. Außerdem besitzt sie den Vorteil einer hohen Fusionsausbeute. In den Fusionspräparaten treten keine toxischen oder immunogenen Produkte oder Viren auf, was in Bezug auf die medizinische Zulassung erfindungsgemäß hergestellter Mikrokapseln von Vorteil ist. Die Elektrofusion wird nach an sich bekannten Fusionsprotokollen durchgeführt. Beispielsweise erfolgt die Fusion suspendierter Zellen mittels elektrischer Impulse in zwei Stufen.

[0026] Zunächst werden die zu fusionierenden Zellen einem elektrischen Wechselfeld ausgesetzt, in dem sie sich infolge von Dielektrophorese gegenseitig anziehen. Im zweiten Schritt wird die Elektrofusion durch kurze elektrische Gleichstrompulse ausgelöst. Dabei kommt es zu Interaktionen von Membranteilen, die zur Fusion führen. Zur Fusion von adhärenter Zellen kann auf die dielektrophoretische Ausrichtung im Wechselfeld verzichtet werden, da die Zellen bereits vorab im engen Membrankontakt stehen.

[0027] Sollte beispielsweise aufgrund von Umgebungsbedingungen oder der Natur der Zelle eine Elektrofusion nicht angebracht sein, so kann im erfindungsgemäßen Verfahren eine chemische Fusion durchgeführt werden. Dafür sind bereits verschiedene chemische Substanzen, wie z. B. Polyethylenglykol (PEG), bekannt.

[0028] In einigen Fällen kann es auch von Vorteil sein, erfindungsgemäß für die Fusion der Zellen Viren einzusetzen. Die Fusion erfolgt beispielsweise mit inaktiviertem Sendai-Virus, Herpes simplex-Virus oder Epstein-Barr-Virus.

[0029] Es hat sich in der Praxis als günstig erwiesen, die Fusion der biologischen Zellen vor dem Einschließen in das Polymermaterial (Verkapselung) durchzuführen, um ggf. nicht fusionierte Zellen abtrennen zu können. Durch Abtrennung nicht fusionierter Zellen werden diese von der Verkapselung ausgeschlossen. Vorteilhafterweise ergibt sich eine erhöhte Proliferationsunterdrückung.

[0030] Die Abtrennung der fusionierten Zellen von den nicht fusionierten Zellen vor der Verkapselung kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. In Abhängigkeit der fusionierten Zelllinien kann eine Abtrennung über Selektionsmedien durchgeführt werden, wozu beispielsweise die ILAT-Selektion zählt. Bei dieser Selektion sterben nicht fusionierte Zellen ab, während die fusionierten Zellen überleben. Allerdings ist dieses Abtrennungsverfahren nur für be-

stimmte selektive Zelllinien geeignet.

[0031] Weitere Trennmethode basieren auf einer

- Nährstofflimitierung in der Proliferation (Absterben der nicht fusionierten Zellen),
- Auftrennung nach der Zellengröße (fusionierte Zellen sind größer als nicht fusionierte Zellen, Trennung z. B. durch Anwendung eines Siebes mit einer definierten Maschenweite),
- Abtrennung mit elektrischen Feldern, insbesondere dielektrophoretische Trennung,
- Erfassung von Dichtegradienten, und/oder
- Erfassung von Größenunterschieden nach der Fusion mittels Durchflußzytometrie (FACS).

[0032] Ein weiteres vorteilhaftes Verfahren zur Abtrennung der nicht fusionierten Zellen besteht in der Ausübung eines hypotonen Schocks. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft, dass die fusionierten Zellen einen großen Überschuss an Plasmamembran besitzen und damit eine größere osmotische Resistenz aufweisen. Bei dieser Anwendung müssen für jede Zelllinie bestimmte Osmolaritäten (0 bis 200 mOsm), bestimmte Inkubationszeiten (3 bis 30 min) und bestimmte Ausheilzeiten (10 min bis 2 h) zwischen Fusion und hypotonem Schock ausgewählt werden.

[0033] Schließlich können die zu fusionierenden Zellchargen, gleicher oder unterschiedlicher Art, vor der Fusion mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiert werden (FACS, Fluoreszenzmikroskopie), um nach der Fusion über Fluoreszenzanalyse die fusionierten Zellen von den nicht fusionierten zu unterscheiden und damit abzutrennen.

[0034] Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die beschriebenen Methoden zur Abtrennung der nicht fusionierten Zellen zu kombinieren.

[0035] Alternativ kann die Fusionsbehandlung der Zellen auch nach dem Einschließen in das Polymermaterial, vor oder nach dessen Vernetzung zur Bildung der Mikrokapsel erfolgen. Hierzu wird eine Zahl pro Volumeneinheit zu verkapselnden Zellen so hoch gewählt, dass sich durch Dielektrophorese ein Membrankontakt ausbilden kann. Die Fusionsbedingungen werden unter Berücksichtigung der Beeinflussung des elektrischen Feldes durch das Kapselmaterial eingestellt.

[0036] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden Mikrokapseln mit Zellen hergestellt, die zunächst adhärent auf einer Festphase aufgewachsen sind. Als Festphase werden beispielsweise Kunststoffkugeln (sogenannte Beads), wie z. B. Cytodex, Alginatkugeln (siehe EP 98 101 337) oder Collagenbeschichtete Hydrogelmatrizen, oder planare Oberflächen verwendet. Die Verwendung adhärent gewachsener Zellen ist für die Fusion der Zellen vor oder ggf. nach der Verkapselung von Vorteil. Die Zellen befinden sich auf der Festphase in direktem Kontakt, so dass zur Fusion auf eine Ausrichtung der Zellen verzichtet werden kann. Dies ist von besonderem Vorteil, wenn die Fusion nach der Verkapselung erfolgt.

[0037] Gemäß einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung werden die adhären Zellen der Fusion unterzogen, anschließend von der Festphase in eine Suspension überführt und schließlich in einem Polymermaterial verkapselt. Die Überführung in die Suspension erfolgt durch Ablösen von der Festphase nach an sich bekannten Verfahren, z. B. durch enzymatische oder mechanische Einwirkungen.

[0038] Die Erfindung umfasst die Verkapselung von Zellen gleicher oder verschiedener Spezies. Die erfindungsgemäß vorgesehene Fusion ist entsprechend eine homologe Fusion, bei der gleichartige Zellen verschmolzen werden, oder eine heterologe Fusion zwischen verschiedenartigen

Zellen. Ein besonderer Vorteil der heterologen Fusion besteht dann, wenn die verschiedenen Zellarten verschiedene Wirksubstanzen erzeugen. Falls beispielsweise eine erste Zellart A einen Faktor 1 und eine zweite Zellart B einen Faktor 2 sezerniert, können fusionierte Zellen A + B beide Faktoren sezernieren. Dies ist für die therapeutische Verwendung transplanterter Mikrokapseln von großem Vorteil.

[0039] Die heterologe Fusion wirkt sich auch bei der Erzeugung von Wirksubstanzen mit besonders großen, therapeutisch wirksamen Molekülen aus, die aus verschiedenen Domänen bestehen. Zwei verschiedene Zelllinien generieren beispielsweise zwei verschiedene Domänen. Das aus beiden Domänen gebildete therapeutische Molekül wird in der Mikrokapsel und bei genügend hoher Expression auch außerhalb der Mikrokapsel am Ort der Transplantation bereitgestellt. Die Domänen werden außerhalb der Mikrokapsel kombiniert und damit zur aktiven Form überführt.

[0040] Zur Herstellung der Mikrokapseln werden beispielsweise gemäß DE-OS 42 04 012 fusionierte Zellen in einer Lösung eines hochgereinigten Alginats suspendiert. Diese Suspension wird dann durch eine Sprühdüse geblasen. Bei dem am Düsenausgang entstehenden Tropfen umschließt die äußere Alginatlösung die in der Alginatlösung suspendierten fusionierten Zellen. Die Zellen liegen gleichsam als in der Alginatmatrix eingeschlossen vor. Die Alginattropfen werden anschließend mit einer Vernetzerlösung (z. B. Bariumsalzlösung) vernetzt, wonach die Kapseln dann mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen werden.

[0041] Beispiele für erfindungsgemäß verkapselte Gewebezellen sind fusionierte Zellen aus dem Nebenschilddrüsengewebe, der Bauchspeicheldrüse, der Nebennierenrinde, sowie Knochenmarkszellen, Lymphknoten Zellen, Knorpelzellen und Osteoblasten.

[0042] Des Weiteren ist es auch möglich, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Zelllinien zu verkapseln, die den Vorteil haben, dass Plasmide mit Genen, die für einen therapeutischen Faktor codieren, eingeschleust und exprimiert werden können. Zu den Zelllinien zählen beispielsweise VERO (kidney cells, adulter African green Monkey), CHO (Chinese hamster ovary cells), hEK 293 (human embryonal kidney cells), Hep G2 (Leberkarzinomzelllinie als Test für EPO-Freisetzung),

TF1 (human erythroleukaemia), Burkitt (B-Zellenlymphoma), und primäre Zellen und Stammzellen.

[0043] Vor Implantation in den Empfänger ist es empfehlenswert, die Zellen einem Funktionstest (Ermittlung der Lebendzellzahl) zu unterwerfen. Die Funktion kann getestet werden, indem der Faktor, den die fusionierte Zelle sezerniert, im Überstand, vor und nach der Verkapselung gemessen wird. Darüber hinaus können ebenfalls gängige Vitalitätstests durchgeführt werden. Dazu gehören der Propidiumiodid-Nachweis und der Trypanblau-Nachweis. Bei adhären wachsenden Zellen wird auch ihre Fähigkeit untersucht, wieder adhären zu werden. Zusätzlich werden Differenzierungstests nach der Aktivierung, z. B. DMSO bei Friend-Zellen zum Nachweis von Hämoglobin, angewandt.

[0044] Die nach dem erfindungsgemäß hergestellten verkapselten biologischen Zellen sind hervorragend in der Transplantationschirurgie, in der immunisierten Transplantation sowie in der Produktion von Wirkstoffen, insbesondere Arzneimitteln, Metaboliten, Nährstoffen, Vorstufen von Chemikalien usw., z. B. in einem Bioreaktor, einsetzbar.

[0045] Beispielsweise können die folgenden Wirkstoffe durch Transplantation verkapselter biologischer Zellen in den Empfänger abgegeben werden:

Parathormon,

Insulin,
 Erythropoietin (Dialysepatienten),
 Interferon alpha (Hepatitis),
 Interferon beta (Multiple Sklerose),
 Endostatin (Tumorbekämpfung),
 Angiostatin (Tumorbekämpfung),
 Glukozerebrosid Glukosidase (Morbus Gaucher),
 TNF alpha Rezeptor oder Antikörper (rheumatoide Arthri-
 tis),
 Gerinnungsfaktoren, z. B. Faktor VIII oder Faktor IX (Hä- 10
 mophilic), und
 Dopamin (Parkinson).
 [0046] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die
 Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten verkapsel- 15
 ten biologischen Zellen als immunisierte Transplantate in
 der Transplantationschirurgie.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von biologisch wirksamen 20
 Mikrokapseln durch Einschließen von biologischen Zellen in einer Umhüllung aus einem biokompatiblen Polymermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen einer Fusionsbehandlung unterzogen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem bei der Fusionsbehandlung mindestens drei Zellen fusioniert werden. 25
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Fusionsbehandlung der Zellen vor dem Einschließen in 30
 die Umhüllung durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem nach der Fusionsbehandlung und vor dem Einschließen in die Umhüllung nicht fusionierte Zellen entfernt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die nicht fusionierten Zellen durch Selektion, Nährstofflimitierung in 35
 der Proliferation, Zellgrößenauftrennung, elektrische Felder, einen Dichtegradienten, Durchflusszytometrie, Ausbildung eines hypotonen Schocks und/oder Fluoreszenzmarkierung von fusionierten Zellen getrennt 40
 und entfernt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Fusionsbehandlung der Zellen nach dem Einschließen in der Umhüllung durchgeführt wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem die Zellen im frei suspendierten Zustand oder im adhären- 45
 ten Zustand der Fusionsbehandlung unterzogen werden.
8. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem die Fusionsbehandlung eine 50
 Elektrofusion der Zellen oder eine Behandlung der Zellen mit chemischen Substanzen oder mit Viren umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem zur chemischen Fusion eine Behandlung mit Polyethylenglykol 55
 erfolgt.
10. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem zur viralen Fusion Viren verwendet werden, die inaktivierten Sendai-Virus, Herpes simplex-Virus oder Epstein-Barr-Virus umfassen. 60
11. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem als Polymermaterial natürliche und/oder synthetische Polymere verwendet werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem als natürliche Polymere Alginatpolymere verwendet werden. 65
13. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Ansprüche, bei dem Zellen verwendet werden,

die mindestens einen Wirkstoff in ihre Umgebung sezernieren.

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem Zellen verwendet werden, die aus biologischem Gewebe oder aus kultivierten Zelllinien stammen.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, bei dem Zellen verwendet werden, die keine Oberflächenantigene aufweisen, die MHC-Antigene der Klasse I umfassen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem Zellen verwendet werden, die zu einer Zelllinie von Burkitt-Zellen gehören.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem Zellen verwendet werden, die zur Burkitt-Zelllinie Ramos gehören.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, bei dem Zellen verwendet werden, die einer genetischen Transformation unterzogen wurden, bei der den Zellen genetisches Material zugefügt wird, das die Produktion des mindestens einen Wirkstoffs kodiert.

19. Verfahren zur Herstellung von biologisch wirksamen Mikrokapseln durch Einschließen von biologischen Zellen in einer Umhüllung aus einem biokompatiblen Polymermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen zur Burkitt-Zelllinie Ramos gehören und einer Behandlung unterzogen werden, die eine genetischen Transformation und eine Fusionsbehandlung umfasst, wobei bei der genetischen Transformation die Zellen zur Produktion mindestens eines Wirkstoffs eingerichtet und bei der Fusionsbehandlung fusioniert werden.

20. Mikrokapsel aus einem biokompatiblen Polymermaterial, die fusionierte biologische Zellen enthält.

21. Mikrokapsel nach Anspruch 20, die homolog fusionierte Zellen enthält.

22. Mikrokapsel nach Anspruch 20, die heterolog fusionierte Zellen enthält.

23. Mikrokapsel nach einem der Ansprüche 20 bis 22, bei der die Zellen adhären mit Festphasen verbunden sind.

24. Mikrokapsel nach einem der Ansprüche 20 bis 23, bei der die Zellen frei von Oberflächenantigenen sind, die MHC-Antigene der Klasse I umfassen.

25. Mikrokapsel nach Anspruch 24, bei der die Zellen zur Burkitt-Zelllinie Ramos gehören.

26. Mikrokapsel nach Anspruch 25, bei der die Zellen genetisch transformierte Zellen der Burkitt-Zelllinie Ramos sind.

27. Mikrokapsel nach einem der Ansprüche 20 bis 26, bei der das Polymermaterial Alginatmaterial umfasst.

28. Verwendung eines Verfahrens oder einer Mikrokapsel nach mindestens einem der vorangegangenen Ansprüche:

in der Transplantationschirurgie,
 zur immunisierten Transplantation, und/oder
 in der Produktion von Wirkstoffen, insbesondere Arzneimitteln, Metaboliten, Nährstoffen und Vorstufen von Chemikalien.

- Leerseite -